

**Thermostable mutants of D-N-alpha-carbamoylase - used in the production of D-alpha-amino acids****Patent Assignee:** ENIRICERCHE SPA; ENICHEM SPA**Inventors:** CARPANI G; GALLI G S; GRANDI G; GRIFANTINI R; GALLI G**Patent Family**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
<u>EP 780473</u>	A2	19970625	EP 96118671	A	19961121	199730	B
JP 9173068	A	19970708	JP 96355570	A	19961224	199737	
<u>EP 780473</u>	A3	19971203	EP 96118671	A	19961121	199817	
KR 97042446	A	19970724	KR 9669912	A	19961221	199836	
IT 1277125	B	19971204	IT 95MI2700	A	19951221	199843	
<u>US 5877003</u>	A	19990302	US 96762433	A	19961209	199916	
			US 971219	A	19971230		
<u>US 5877002</u>	A	19990302	US 96762433	A	19961209	199916	

**Priority Applications (Number Kind Date):** IT 95MI2700 A ( 19951221)**Cited Patents:** EP 610517 ; EP 677584 ; EP 677585**Patent Details**

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
<u>EP 780473</u>	A2	E	19	C12N-015/55	
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU NL SE					
JP 9173068	A		13	C12N-015/09	
<u>US 5877003</u>	A			C12N-001/21	Div ex application US 96762433
<u>EP 780473</u>	A3			C12N-015/55	
KR 97042446	A			C07B-047/00	

IT 1277125	B			C12N-000/00
US 5877002	A			C12N-009/80

**Abstract:**

EP 780473 A

New thermostable mutants of D-N-  $\alpha$  -carbamoylase have at least one of the amino acid residues Met184, Thr212, Thr262 and Phe304 of wild-type D-N-  $\alpha$  -carbamoylase replaced by a different natural amino acid.

USE - The mutated enzyme may be used for production of D-  $\alpha$  -amino acids by the stereospecific conversion of D-N-  $\alpha$  -carbamoyl amino acids or racemic mixtures of 5-substituted hydantoins using a microorganism capable of producing a mutant D-N-  $\alpha$  -carbamoylase as above or an enzyme system comprising D-hydantoinase and a mutant D-N-  $\alpha$  -carbamoylase as above, optionally immobilised on an insoluble solid carrier. D-  $\alpha$  -Amino acids are intermediates for pharmaceuticals (e.g. penicillins and cephalosporins), pesticides (e.g. fluvanylate) and sweeteners.

ADVANTAGE - The mutants have better thermal stability than wild-type D-N-  $\alpha$  -carbamoylase, allowing higher reaction temperatures to be used and thus giving higher conversion rates, while their activity is at least as high as that of the wild-type enzyme.

Dwg.0/2

Derwent World Patents Index

© 2005 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 11344244

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-173068

(43)公開日 平成9年(1997)7月8日

(51)Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
1/21			1/21	
9/88			9/88	
// (C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 未請求 請求項の数29 F D (全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-355570

(22)出願日 平成8年(1996)12月24日

(31)優先権主張番号 M I 9 5 A 0 0 2 7 0 0

(32)優先日 1995年12月21日

(33)優先権主張国 イタリア (I T)

(71)出願人 595026335

エニリチエルケ、ソシエタ、ベル、アチオニ

ENIRICERCH E S. P. A.

イタリア国サン、ドナート、ミラネーゼ、

ピア、エッフェ、マリターノ、26

(72)発明者 レナータ、グリファンティーニ

イタリア国ミラノ、ピア、ピエロ、カレータ、14

(72)発明者 ジョバンナ、カルバーニ

イタリア国セルニャーノ、ピアッツア、4、ノベンブレ、17

(74)代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

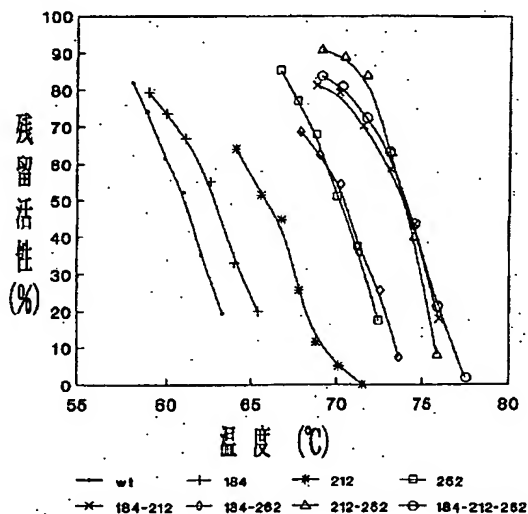
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D - N -  $\alpha$  - カルバモイラーゼの熱安定性変異体

(57)【要約】

【課題】 野生型酵素と比較して未変化のまたは改善された活性を有し、D -  $\alpha$  - アミノ酸の製造に特に有用であるD - N -  $\alpha$  - カルバモイラーゼ熱安定変異体の提供。

【解決手段】 野生型D - N -  $\alpha$  - カルバモイラーゼのアミノ酸配列のアミノ酸残基Met184、Thr212、Thr262およびPhe304のうち少なくとも1つが天然アミノ酸のグループから選択される異なる残基で置換されている、D - N -  $\alpha$  - カルバモイラーゼの熱安定変異体。図1は野生型および変異体の熱安定性をD-フェニルグリシンのカルバモイルの残留活性によって示した図である。■：野生型株；+：変異体184；\*：変異体212；□：変異体262；×：変異体184 - 212；◇：変異体184 - 262；△：変異体212 - 262；○：変異体184 - 212 - 262。



## 【特許請求の範囲】

- 【請求項1】野生型D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼのアミノ酸配列のアミノ酸残基Met184、Thr212、Thr262およびPhe304のうち少くとも1つが天然アミノ酸のグループから選択される異なる残基で置換されていることを特徴とする、D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの熱安定変異体。
- 【請求項2】アミノ酸残基Met184がL-ロイシンで置換されている、請求項1に記載のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの熱安定変異体。
- 【請求項3】アミノ酸残基Phe304がL-イソロイシンで置換されている、請求項1に記載のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体。
- 【請求項4】アミノ酸残基Thr212がL-アラニンで置換されている、請求項1に記載のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体。
- 【請求項5】アミノ酸残基Thr262がL-アラニンで置換されている、請求項1に記載のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体。
- 【請求項6】アミノ酸残基Met184およびPhe304がアミノ酸残基で同時に置換されている、請求項1に記載のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体。
- 【請求項7】アミノ酸残基Met184およびThr212がアミノ酸残基で同時に置換されている、請求項1に記載のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体。
- 【請求項8】請求項1に記載されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列。
- 【請求項9】請求項2に記載されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列。
- 【請求項10】請求項3に記載されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列。
- 【請求項11】請求項4に記載されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列。
- 【請求項12】請求項5に記載されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列。
- 【請求項13】請求項6に記載されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列。
- 【請求項14】請求項7に記載されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列。
- 【請求項15】請求項8～14のいずれか一項に記載されたヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクター。
- 【請求項16】pSM754、pSM755、pSM756、pSM761、pSM762、pSM763、pSM764、pSM765、pSM770およびpSM771から選択される、請求項15に記載の発現ベクター。
- 【請求項17】寄託番号CBS665.95のもと、Centraalbureau Voor Schimmelculturesに寄託された発現ベクターpSM754。
- 【請求項18】寄託番号CBS666.95のもとCent

raalbureau Voor Schimmelculturesに寄託された発現ベクターpSM755。

【請求項19】寄託番号CBS667.95のもとCentraalbureau Voor Schimmelculturesに寄託された発現ベクターpSM756。

【請求項20】寄託番号CBS758.95のもとCentraalbureau Voor Schimmelculturesに寄託された発現ベクターpSM769。

【請求項21】請求項15～20に記載された発現ベクターで形質転換されたBacillus subtilis およびEscherichia coliから選択される微生物。

【請求項22】Escherichia coli SMC341 (pSM754) CBS665.95である、請求項21に記載の微生物。

【請求項23】Escherichia coli SMC342 (pSM755) CBS666.95である、請求項21に記載の微生物。

【請求項24】Escherichia coli SMC343 (pSM756) CBS667.95である、請求項21に記載の微生物。

【請求項25】Escherichia coli SMC355 (pSM769) CBS758.95である、請求項21に記載の微生物。

【請求項26】請求項15～20に記載された発現ベクターで形質転換されたEscherichia coliおよびBacillus subtilis から選択される微生物を適切な培地で培養し、こうして得られた変異体を分離および精製すること、請求項1に記載されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体の製造法。

【請求項27】変換反応がD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの熱安定変異体またはD-ヒダントイナーゼとD-カルバモイラーゼの変異体からなる酵素系を生産できる微生物の存在下で行われ、D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの上記変異体が天然アミノ酸のグループから選択される異なる残基で置換された野生型D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼのアミノ酸配列のアミノ酸残基Met184、Thr212、Thr262およびPhe304のうち少くとも1つを有していることで特徴付けられる、D-N- $\alpha$ -カルバモイルアミノ酸または5-置換ヒダントインのラセミ混合物の立体特異的変換によるD- $\alpha$ -アミノ酸の生産方法。

【請求項28】変換反応が、D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体またはD-ヒダントイナーゼとD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体からなる酵素系を生産できる微生物から単離された上記変異体または上記酵素系の存在下で行われる、請求項28に記載の方法。

【請求項29】D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの熱安定変異体または上記変異体を含んだ酵素系が不溶性固体キャリアに固定されている、請求項28に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の背景】

## 発明の分野

本発明はD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの熱安定変異体、それらの製造手段および方法、並びにD- $\alpha$ -アミノ酸の生産におけるそれらの使用に関する。

## 【0002】背景技術

D- $\alpha$ -アミノ酸は、薬理活性物質、農薬および甘味料の製造に際して重要な中間体である。例えば、D-フェニルグリシンおよびD-p-ヒドロキシフェニルグリシンは半合成ペニシリンおよびセファロスポリンの合成に用いられ、一方D-バリンは殺虫剤フルバニレート製造、およびD-アラニン甘味料の生産に用いられる。化学または酵素加水分解によりそれらのN-カルバモイル誘導体のラセミ混合物またはそれらの対応5-置換ヒダントインのラセミ混合物から出発したD- $\alpha$ -アミノ酸の製造は、当業界で公知である。

【0003】しかしながら、通常カンファースルホン酸の使用に基づく化学的方法は、D- $\alpha$ -アミノ酸の分割および精製に必要とされる複雑な操作から生じる欠点を有している。結果的に、これらの方法は工業的観点から経済的にほとんど興味をもたれていない。

【0004】他方、微生物から得られた酵素または酵素系を用いる方法(EP-199943、EP-309310、US 4312948、FR 2456728)は、これら酵素の高い生産および精製コストだけでなく、知られているように、例えば熱変性、酸化現象と疎水性および/または共有タイプの結合に起因する凝集のようないくつかのファクターに基づくそれらの不安定さによっても制限を受けている。したがって、これら不安定さの原因を特定することは、酵素的工程を改善してより競争的にするための解決策を見つける上で最も重要である。しかしながら、(i)この不安定さの原因および(ii)酵素の活性を変えることなく不安定さを解消または減少させる上で可能な方法を正確に特定できるには、困難なことが多い。

【0005】ここで、酵素系という用語は、D-ヒダントインをD-カルバモイル誘導体および後者をD-アミノ酸に各々変換するD-ヒダントイナーゼおよびD-カルバモイラーゼ酵素からなる系に関する。D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼは、D- $\alpha$ -アミノ酸の生産方法に用いられる操作条件下でヒダントイナーゼよりも低い安定性を有している。

【0006】改善された安定性を有するD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体は、特許出願EP-A-677584に記載されるようにして得られた。高温で更に安定なカルバモイラーゼは、対応アミノ酸への基質の変換速度を改善させて、生産コストを顕著に低下させることが明らかである。

【0007】例えば、特許出願EP-610517は十

分に決定された部位でアミノ酸残基の1以上の置換により得られるD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの熱安定変異体について記載している。しかしながら、同じ触媒バイオマスの更に熱安定な変異体は、本発明の変異体と比較して低い活性を有している。

## 【0008】

【発明の概要】本発明者らは、今般、アミノ酸配列の十分に決定された部位で1以上の残基の置換により、野生型酵素と比較して未変化のまたは改善された酵素活性を有するD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの熱安定変異体を得ることができることを見出した。これらの変異体では、D- $\alpha$ -アミノ酸の生産に慣例的な方法に現在用いられているよりも高温で操作することができ、このため異性体Lのラセミ化速度、溶解性および基質の加水分解速度を増加させることができる。これは、結果的に、基質から対応D- $\alpha$ -アミノ酸への完全変換を得るために必要なバイオマスの量と時間を減少させる。

【0009】本発明の第一面は184、212、262および304位のうち少なくとも1つのアミノ酸残基が天然アミノ酸のグループから選択される異なる残基で置換されていることで特徴付けられるD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの熱安定変異体に関する。本発明のもう1つの目的は、改善された熱安定性を有するD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの少なくとも1つの変異体についてコードするヌクレオチド配列に関する。

【0010】本発明の別な目的は、上記配列を含んでなる複製組換え発現ベクターに関する。本発明のもう1つの目的は、上記ベクターで形質転換された微生物に関する。

【0011】本発明は、形質転換された微生物を適切な条件下で増殖させ、こうして得られた変異体を分離することからなる、改善された熱安定性を有するD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの少なくとも1つの変異体の製造法にも関する。本発明の別な目的は、これらの形質転換された微生物の、またはD- $\alpha$ -アミノ酸の生産方法で上記微生物から得られたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体の用途に関する。

【0012】本発明の他の目的は、下記説明と下記例から明らかになるであろう。

## 【0013】

【発明の具体的説明】本発明のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体は、野生型酵素のアミノ酸配列の184、212、262および304位のうち少なくとも1つの残基がL-アラニン、L-セリン、L-リジン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、L-グリシン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-チロシン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-メチオニンまたはL-プロリンから選択される異なる残基で置換されてい

ることと特徴付けられる。

【0014】本発明の好ましい変異体は、残基Met184がL-ロイシン(Leu)で、残基Thr212およびThr262がL-アラニン(Ala)で、残基Phe304がL-イソロイシン(Ile)で置換されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体である。本発明の特に好ましい変異体は、184、212、262および304位のうち少くとも2つのアミノ酸残基が置換されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体である。

【0015】本発明のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体は、

- a) D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼについてコードする遺伝子に1以上の変異を導入し、
- b) 工程a)で得られた変異遺伝子をクローニングベクターにクローン化し、
- c) 工程b)で得られた組換えベクターで宿主株を形質転換し、
- d) 工程c)のように形質転換された宿主株を適切な培地で培養し、最後に
- e) こうして得られたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体を分離および精製することを含む方法で製造することができる。

【0016】変異されるD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼ遺伝子に関するかぎり、これは*Pseudomonas*、*Hansenula*、*Agrobacterium*、*Aerobacter*、*Aeromonas*、*Bacillus*、*Moraxella*、*Brevibacterium*、*Flavobacterium*、*Serratia*、*Micrococcus*、*Arthrobacter*または*Paracoccus*のような微生物から単離することができる。これら微生物の具体例は*Bacillus macroides* ATCC 12905、*Aerobacter cloacae* IAM 1221、*Agrobacterium* sp. IPI-671、*Agrobacterium radiobacter* NRRLB 11291、*Pseudomonas* sp. FERM BP 1900 である。本発明の1態様によれば、*Agrobacterium radiobacter* NRRLB 11291 から単離された遺伝子が変異された。

【0017】遺伝子中で変異の導入は、例えば特定部位変異誘発、または好ましくはランダム変異誘発のような公知のインビトロ変異誘発技術の1つで行うことができる。後者はLeung D.W. et al., 1989, Technique, 1, 11-15 による指示に従いPCR技術(ポリメラーゼ鎖反応)を用いて行うことができ、このため(1)増幅される断片に対して上流および下流に2つのオリドヌクレオチド(順方向および逆方向)の合成、および(2)用いられる鋳型に相補的でない塩基を約1~2%の頻度でポリメラーゼ酵素が挿入する条件下における断片の増幅としてまとめることができる。

【0018】本発明の態様によれば、ポリヒスチジン(ポリ-His)のテイルをコードする配列に3'末端で融合されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの遺伝子は、IMAC技術(Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)により可能な精製と同時に固体キャリ

アへの固定を行う、ランダム変異誘発に付された。

【0019】特に、下記ペアのオリドヌクレオチドが増幅に用いられた:

a) 5' CTC GGC TTC CCG GTC  
TAT GAC GTCGAC 3' (順方向)

b) 5' GGC TTA CTT GTC TGC  
TTT C 3' (逆方向)

オリドヌクレオチドは、市販されているいずれかの装置を用いて、公知の方法で合成できる。

【0020】増幅産物は、適切な制限酵素で切断後に精製され、同じ制限酵素で切断されたベクターに結合された。リガーゼ反応はT4 DNAリガーゼ酵素の存在下で常法を用いて行える。

【0021】次いでリガーゼ混合物は、例えばエレクトロポレーション(Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W., N.A.R. (1988), 16, 6127)でコンピテント化された宿主細胞、好ましくは*E. coli*を形質転換するために用いられ、形質転換株は抗生物質の存在下適切な培地で培養された。

【0022】熱安定化変異を有するクローンの選択は、ニトロセルロース膜(MFS, Sartorius)上で各形質転換プレートからのレプリカを作ることにより行われた。これらのレプリカはコロニーを溶菌させるために凍結-解凍サイクルに付され、その後48.5°Cで16時間おかれた。この不活化処理後、膜は基質としてD-アミノ酸のカルバモイル、緩衝液リン酸ナトリウムpH 7、アガロース(BioRad)およびレッドフェノールを含むプレート上に移され、37~40°Cでインキュベートされた。数時間後にコロニーは赤-紫色を有していたが、野生型コロニーはもはやいかなる活性も有していなかった。

【0023】様々な熱安定コロニーがこのスクリーニングで単離された。次いでこれらのコロニーから抽出されたプラスミドDNAは、ランダム変異誘発により導入された変異をDNAレベルで確認するために配列決定された。配列の分析はSangerの酵素法(Sanger, F. & Coulson, A.R., (1975), J. Mol. Biol., 94, 441-443)に基づき公知技術を用いて行える。

【0024】下記変異が各クローンで確認された: Met184→Leu、Thr212→Ala、Thr262→AlaおよびPhe304→Ile

【0025】熱安定化変異が確認されたら、それらはポリ-Hisテイルを有さないカルバモイラーゼ遺伝子中に導入された。遺伝子の十分に決定された部位への変異の導入は、公知のインビトロ変異誘発技術の1つを用いて行える。DNA配列で特定の変異を起こす様々な方法の中で最もよく知られているのは、合成一本鎖オリゴヌクレオチドを用いる場合である。

【0026】特に、Zoller, M.J. and Smith, M., (1982), Nucleic Acid Res., 10, 6487-6500に記載された方法の修正

法、即ち

1) D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの遺伝子またはこの一部(標的配列)をタイプM13のバクテリオファージまたはそれに由来するプラスミド中に挿入して、それを変異産物の合成のための“型”(鋳型)として使用できる一本鎖形で製造し、

2) 変異を決定する内部部分以外は変異される配列に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、

3) 合成オリゴヌクレオチドを“型”にアニーリングし(それは第二修飾鎖の合成のための“プライマー”として作用する)、

4) インビトロ重合および結合過程により二本鎖環状構造を再生し(そのうち1本の鎖は親のものであり、他は望ましい変異をもたらす)

5) 親鎖を除いて、双方の鎖が望ましい変異を有する二本鎖環状構造をインビトロ重合および結合過程により再形成させ、

6) コンピテント宿主細胞を形質転換させるために二本鎖形を用いて、変異体および野生型クローンの群を得、最後に

7) 変異体クローンを選択することを含む方法が用いられた。

【0027】上記のように操作して、野生型酵素のアミノ酸配列の184、212、262および304位の残基が異なる残基で置換されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの単および多重変異体を作製された。

【0028】本発明によれば、上記のように変異された遺伝子は、宿主株でその発現を調節する配列のコントロール下にその遺伝子を正しくおくことにより、クローニングベクター中に導入できる。その目的に適したベクターは、市場または権威ある収集センターで入手しうるプラスミド、バクテリオファージおよびコスミドから選択できる。

【0029】本発明の目的に適したベクターの非制限例は、プラスミドpSM671 CBS205.94である。

【0030】本発明の変異体の活性および熱安定性の特徴を明らかにするために、上記のように変異された遺伝子を含むベクターで形質転換されたE.coliの細胞が適切な培地において37℃で16時間培養された。次いで細胞溶解物から得られたタンパク質抽出物はSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムを含有したポリアクリルアミドゲルでの電気泳動)により分析された。結果は、変異体が互いに匹敵する量で野生型酵素の発現レベルに相当して可溶性で発現されることを示した。Weatherburn, M.W. (1967), (Anal. Chem., 39:971)に記載されたような生抽出物で行われた活性試験では、野生型酵素の場合に匹敵するかまたはそれよりも良い活性をすべての変異体で示した。

【0031】50～80℃の温度で30分間行われた安

定性研究では、野生型D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの場合よりも高い熱安定性を試験された変異体で示した。

【0032】本発明のもう1つの態様によれば、D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異遺伝子は単一プロモーターにより調節された発現オペロン系を作製するためにヒダントイナーゼ遺伝子とタンデムに結合させることができる。変異されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼ遺伝子または変異されたヒダントイナーゼ-カルバモイラーゼオペロンを含んだ組換えベクターは、B.subtilisまたはE.coliから選択された宿主微生物中に導入できる。

【0033】次いで、これらの微生物は、炭素および窒素の同化源と、様々なカチオン、アニオン、および場合によりビオチンまたはチアミンのような微量のビタミン、またはアミノ酸を含有した水性培地中において好気性条件下で培養される。

【0034】同化炭素源にはグルコース、加水分解デンプン、糖蜜、スクロースまたは他の慣用的な炭素源のような炭水化物がある。窒素源の例は、例えば硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムまたは炭酸アンモニウムのようなアンモニウムのミネラル塩と尿素、あるいはペプトン、酵母エキスまたは肉エキスのような有機または無機窒素を含有した物質から選択できる。

【0035】下記カチオンおよびアニオンも本発明の目的に同等に適している：カリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、カルシウム、酸のリン酸、硫酸、クロリド、マンガンおよび硝酸。発酵は25～40℃の温度、6～7.5、好ましくは6.5～7.0のpHで攪拌しながら行われる。

【0036】遠心または口過のような慣用的技術で培地から回収された細胞(バイオマス)は、N-カルバモイルアミノ酸のラセミ混合物、あるいは細胞がヒダントイナーゼおよび修飾カルバモイラーゼ酵素を発現するときには5-置換ヒダントインのラセミ混合物の変換によるD- $\alpha$ -アミノ酸の生産に用いられる。一方、超音波処理またはFrench-Pressによる細胞の破壊から得られた細胞抽出物、精製または部分精製酵素、あるいは不溶性固体キャリアに固定された酵素を用いることもできる。

【0037】精製は、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィーまたはアフィニティクロマトグラフィー、例えばIMAC(Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)のような慣用的技術の1つを用いて行える。本発明の酵素の固定に適した固体キャリアの例には、例えばBrCNで活性化されたEupergit(商標名)C、Sepharosio(商標名)等のような、既に活性化された市販製品がある。

【0038】本発明の態様によれば、ポリヒスチジンのテイル部に融合された変異体はIMAC技術により精製されて、同時に固定できる。多くのD-N- $\alpha$ -カルバモイルアミノ酸および5位で置換されたヒダントインが

本発明の目的に使用できる。5位で可能な置換基は1～6の炭素原子を有する直鎖または分岐アルキル基から選択でき、それはヒドロキシル、カルボキシル、スルフィドリルまたはアミノ基、あるいはオルト、メタまたはパラ位に1以上の置換基を有してもよいフェニルまたはベンジル基でまたは多置換できる。

【0039】5-置換ヒダントインの例は、D、L-5-フェニルヒダントイン、D、L-5-p-ヒドロキシフェニルヒダントイン、D、L-5-メチルヒダントイン、D、L-5-イソプロピルヒダントイン、D、L-5-チエニルヒダントイン、D、L-5-p-メトキシフェニルヒダントイン、D、L-5-p-クロロフェニルヒダントイン、D、L-5-ベンジルヒダントインである。対応D- $\alpha$ -アミノ酸への出発基質(5-置換ヒダントインまたはD-N- $\alpha$ -カルバモイルアミノ酸)の変換反応は、好ましくは25～70℃の温度で密閉装置において窒素雰囲気下で行われる。

【0040】反応培地のpHは6～10、好ましくは7～8。5の値内に維持される。pHのこの調節は、例えばアンモニア、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウムまたはカリウムの水溶液のような塩基性水溶液の添加により行える。基質の初期濃度は通常2～30重量%である。反応混合液に加えられるバイオマスまたは酵素の量は、酵素に対する基質の具体的親和性に依存する。一般的には、1/1～1/50のバイオマス/基質重量比が使用できる。

【0041】本発明の方法で製造されたD- $\alpha$ -アミノ

a) 5' AAC GAT CGC CGC TGG CCT 3' (順方向)  
Hind III

b) 5' CC CAA GCT TTA ATG ATG ATG ATG  
Bam HI His His His His  
ATG ATG GCC ACC AAA TTC CGC GAT 3'  
His His Gly Gly (逆方向)

【0045】オリゴヌクレオチドb)は形質転換株の選択に有用な制限部位Bam HIを導入した。そのオリゴヌクレオチドはDNA Synthesizer (商標名) Oligo 1000 (Beckman) を用いて公知の方法により合成される。

【0046】増幅は:

- 1 ngのプラスミドpSM637
- 2.5単位のTaqポリメラーゼ (Boehringer)
- 10 mM トリス-HCl pH 8.3
- 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 50 mM KCl
- 0.01% (重量/容量) ゼラチン
- 1  $\mu$ Mの各プライマー
- 200  $\mu$ Mの各dNTP (dGTP、dATP、dTTPおよびdCTP) を含有した反応混合液 (100  $\mu$ l) を用いてDNA Thermal Cycler (商標名) 480 (Perkin-Elmer Cetus) で行った。

酸は、その等電点でアミノ酸のイオン交換クロマトグラフィーまたは沈降のような古典的方法で反応環境から回収することができる。本発明はA. radiobacter のD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの変異体の生産に関するが、他の微生物から得られた相同的酵素の修飾に適用できることは明らかである。

【0042】本発明によれば、プラスミドpSM754、pSM755、pSM756およびpSM769がCentraalbureau Voor Schimmelcultures, SK Baarn (オランダ) に各々E. coli SMC341、SMC342、SMC343およびSMC355として寄託され、それらは寄託番号CBS 665.95、CBS 666.95、CBS 667.95およびCBS 758.95を各々有する。

【0043】

【実施例】下記実験例は本発明の更に詳しい説明を行うが、その範囲を制限するものではない。

実施例1 D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの遺伝子中へのポリHisテイルの挿入

ポリHisテイル部をコードするヌクレオチド配列を、D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼ遺伝子の3'末端を含む約420塩基対(bp)の領域の増幅により、D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼ遺伝子中に導入した。

【0044】この目的のため、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)技術がプライマーとして下記ペアのオリゴヌクレオチドを用いて行われた:

【0047】パラフィンパール (Ampliwax (商標名) PCR Gem 100 (商標名) - Perkin-Elmer Cetus) の添加および94℃で4分間の変性後に、  
- 94℃で1分間  
- 42℃で1分間  
- 72℃で1分間 (伸長)  
で3サイクル;  
- 94℃で1分間 (変性)  
- 55℃で1分間 (アニーリング)  
- 72℃で1分間30サイクル (伸長)  
- 72℃で8分間 (最終伸長)  
で30サイクルからなるプログラムを開始した。

【0048】こうして得られた増幅産物を3M酢酸Na pH 5.2 (1/10容量) およびエタノール (2倍容量) で沈降させ、40  $\mu$ lの水に再懸濁し、制限酵素Nae IおよびHind III (Boehringer) で切断した。得られた混合物を10%アクリルアミドゲルに担持



させ、100ボルトで2時間泳動させた。ポリHis配列に融合されたD-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼ遺伝子の3'末端を有するDNA断片を含んだ240bpバンドをゲルから切り出し、DNAを37℃で16時間かけて300 $\mu$ lの水で溶出した。沈降後にDNAを15 $\mu$ lのTE(10mMトリスHCl pH7.4、1mM EDTA)に再懸濁した。

【0049】プラスミドpSM637(40 $\mu$ g)を制限酵素NaeIおよびHindIIIで切断し、スクロース勾配用の緩衝液(30mMトリスHCl pH8、10mM EDTAおよび1M NaCl)200 $\mu$ lに再懸濁して、カルバモイラーゼ遺伝子の3'末端を有するDNA断片を除去した。勾配は緩衝液中5%および20%スクロースの溶液を用いて勾配シェーパー(Buchler Auto Densi-Flow IIC)で作った。勾配の全容量は16mlであった。サンプルを勾配の表面に適用して、超遠心機L8-M(Beckman)において20℃の温度でSW28<sup>R</sup>ローターにより25,000rpmで20時間遠心した。次いで勾配を分別して、表面から各400 $\mu$ lの40のフラクションを取り出した。各フラクションの1/10容量をアガロースゲルに担持させ、pSM637に由来する単一ベクターを含んだフラクションを別々に集めた。次いでこれらのフラクションをH<sub>2</sub>Oで1:1希釈し、EtOH(2~3倍容量)から沈降させた。

【0050】断片をH<sub>2</sub>Oに再懸濁した後、リガーゼ反応をベクターpSM637(50ng)を用いて行い、220bpの断片NaeI-HindIII(5ng)を実施例1で記載されたように得た。反応は66mMトリスHCl pH7.6、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオトレイトール(DTT)を含有した反応混合液10 $\mu$ l中T4DNAリガーゼ1Uの存在下において16℃で16時間行なった。

【0051】この混合液の一部(2 $\mu$ l)を用いて、50mM CaCl<sub>2</sub>でコンピテント化されたE.coli 71/18(BRL)の細胞を形質転換させた(Dagert, M. and Ehrlich (1979), Gene, 6:23)。形質転換株はクロラムフェニコール20 $\mu$ g/ml含有のLB寒天培地(0.8%バクトリアプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、寒天18g/l)のアプレートで選択した。

【0052】陽性Cm(商標名)クローン(クロラムフェニコール耐性株)の1つから抽出されたプラスミドDNAをキットSequenase(商標名)バージョン2.0(United States Biochemical)を用いて配列決定し、カルバモイラーゼ遺伝子の3'末端でポリHisテイル部の存在を明らかにした。こうして得られたプラスミドはpSM716と命名した。このプラスミドを含むE.coli株はSMC329と命名した。

【0053】実施例2 D-N- $\alpha$ -カルバモイラーゼの遺伝子の変異体バンクの作製およびスクリーニング

変異誘発はエラー頻度の増加が重合中に生じる条件下でPCRにより行なった(Leung D.W. et al., 1989, Technique, 1, 11-15)。

【0054】下記ペアのオリドヌクレオチドが増幅に用いられた:

a) 5' CTC GGC TTC CCG GTC  
TAT GAC GTCGAC 3' (順方向)

b) 5' GGC TTA CTT GTC TGC  
TTT C 3' (逆方向)

【0055】増幅は:

- 1ngのプラスミドpSM716

- 84ピコモル(pモル)の各オリゴヌクレオチド

- 16.6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

- 67mMトリス-HCl pH8.8

- 6.1mM MgCl<sub>2</sub>

- 6.7mM EDTA pH8

- 0.17mg/ml BSA

- スポットで作られた $\beta$ -メルカプトエタノール10mM

- 10%のDMSO(v/v)

- 0.5mM MnCl<sub>2</sub>

- 0.2mM dATP、1mM dGTP、1mM dTTPおよび1mM dCTP

を含有した反応混合液(100 $\mu$ l)を用いてDNA Thermal Cycler(商標名)480(Perkin-Elmer Cetus)で行った。

【0056】混合液を94℃で7分間の変性と50℃で1分間のプライマーのアニーリングに付した。酵素Taq DNAポリメラーゼ(Boehringer、5U/ $\mu$ l)およびバラフィンパールを加えた後、

94℃で1分間(変性)

50℃で1分間(アニーリング)

70℃で4分間(伸長)

を全部で25サイクルからなる循環プログラムを開始した。

【0057】約500bpの増幅産物を7.5M酢酸NH<sub>4</sub>(0.6倍容量)およびエタノール(2倍容量)で沈降させ、40 $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oに再懸濁した。制限酵素SalIおよびHindIIIで切断後、変異された断片を0.8%で低融点アガロースゲル(Nusieve, FMC BioProducts)で精製した。対象のバンドを切り出し、68℃で15分間おき、GELase(商標名)(Epicentre Technologies)(ゲル重量300mg毎に1U)により45℃で1.5時間処理した。

【0058】平行して、プラスミドpSM637(30 $\mu$ g)を制限酵素SalIおよびHindIIIで切断し、酢酸Naおよびエタノールで沈降させ、緩衝液(30mMトリスHCl pH8、10mM EDTA、1M NaCl)200 $\mu$ lに再懸濁し、実施例1で記載されたように操作してスクロース勾配により精製した。

プラスミドを含有したフラクションを合わせ、水で1:1希釈し、エタノール(2~3倍容量)で沈降させ、TE緩衝液に再懸濁した。

【0059】精製プラスミドpSM637 500ngをリガーゼ混合物80μl中16℃で14時間かけて変異断片と結合させた。

【0060】リガーゼ混合液の一部(1μl)を用いて、エレクトロポレーションでコンピテント化されたE. coli 71/18 (BRL)の細胞を形質転換させた(Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W., N.A.R. (1988), 16, 6127)。次いで細胞をLB培地(10g/l Bacto-Tryptone 商標名 (DIFCO)、5g/l 酵母エキス、5g/l NaCl、300μl 10N NaOH、20μg/ml クロラムフェニコール)にのせて、37℃で約16時間培養した。

【0061】ニトロセルロース膜(MFS, Sartorius)上で各形質転換プレートからレプリカを作った。これらのレプリカを3サイクルの凍結-解凍に付してコロニー

を溶解させ、その後48.5℃で16時間おいた。

【0062】この不活化処理後、膜を20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7、1%アガロース(BioRad)、0.0032%レッドフェノール中に20mM C<sub>12</sub>P<sub>6</sub>G(D-フェニルグリシンのカルバモイル)を含有したプレートに移し、37~40℃でインキュベートした。数時間後に、熱安定カルバモイラーゼ活性をもつコロニーは赤-紫色を有しているが、野生型コロニーはもはや活性を有していなかった。試験の陽性コントロールでは、インキュベートを省略した同様の操作を48.5℃で繰返した。これらの条件下で野生型コロニーは数分後に赤-紫色を有している。

【0063】このスクリーニングでは、3つの熱安定クローンSMC341、SMC342およびSMC343を単離した。クローンから抽出されたプラスミドDNAをSequenaseで配列決定し、表1で示された変異を各クローン毎に特定した:

表1

クローン	プラスミド	変異
SMC341	pSM754	Met184LeuおよびPhe304Ile
SMC342	pSM755	Thr212Ala
SMC343	pSM756	Thr262Ala

【0064】実施例3 単および多重変異体の作製  
熱安定化させる変異は、単および多重変異としてポリ-Hisテイルなしに野生型カルバモイラーゼ遺伝子中に組み込んだ。

【0065】プラスミドpSM637(1μg)を37℃で60分間かけて1単位の制限酵素EcoRIおよびHindIII(Boehringer)で切断した。65℃で10分間にわたり酵素反応を遮断した後、反応混合液を0.8%で低融点アガロースゲルに担持させ、50ボルトで2時間泳動した。次いでD-N-α-カルバモイラーゼについてコードする配列を含んだ915塩基対(bp)のEcoRI-HindIIIバンドをGelase(商標名)(Epicentre Technologies)で精製した。

【0066】このバンドに相当するDNAの断片を同じ制限酵素で既に切断されたベクターM13mp8(50ng)に結合させた。リガーゼ反応は66mMトリスHCl pH7.6、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオトレイトール(DTT)を含有した混合液20μl中T4DNAリガーゼ1Uの存在下にお

いて16℃で16時間行った。

【0067】リガーゼ混合液の一部(5μl)を用いて、50mM CaCl<sub>2</sub>でコンピテント化されたE. coli 71/18 (BRL)の細胞を形質転換させた(Dagert, M. and Ehrlich (1979), Gene, 6:23)。

【0068】次いで形質転換株は40μg/mlのX-Gal(5-ブロモ-4-クロロ-4-インドリル-D-チオガラクトピラノシド)および125μg/mlのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を含有したYT寒天(8g/lバクトトリプトン(DIFCO)、5g/l NaCl)のプレートで選択した。上記のように操作して、多くの陽性組換えブランク(白色)を得たが、これは非組換え体(青色)から容易に区別できた。

【0069】特定部位変異誘発フェーズで鋳型として用いられる一本鎖(ss)バクテリオファージDNAは、正確な挿入を示す陽性ブランクの1つから作った。下記オリゴヌクレオチドは望ましい変異を導入するために合成した:

- (1) 5' GCC CTT AAG TCC CAA CAC CCG  
CCA' CGT 3' は変異Met184→Leuを挿入する;
- (2) 5' GTG GTG GAA GGA CGC CAG ATG  
GTC GTG 3' は変異Thr212→Alaを挿入する;
- (3) 5' TTC CAA CGT CGT GGC CAG GGC  
AAC GAT 3' は変異Thr262→Alaを挿入する;
- (4) 5' AAG CTT CAA ATT TCC GCG ATC  
AG 3' は変異Phe304→Ileを挿入する。

【0070】これらのオリゴヌクレオチドは、37℃で30分間のインキュベーションにより、100mMトリス-HCl pH8、10mM MgCl<sub>2</sub>、5mM DTT、1mM ATPおよび2UのT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Promega) を含有した反応混合液30μl中5'末端でリン酸化した。次いでリン酸化オリゴヌクレオチドはキット“Sculptor (商標名) インビトロ変異誘発系” (Amersham) を用いてインビトロ変異誘発反応で単独および組み合わせて用いた。

【0071】得られたブランクの一部をE.coli TGI (Amersham) の培養物に感染させるために用い、その後一本鎖 (ssDNA) および二本鎖 (RF, dsDNA) バクテリオファージDNAを各培養物から抽出した。

【0072】ssDNAをSanger et al. (PNAS) (1977) 74:5463に記載された方法に基づきキット“Sequenase (商標名) 2.0” (United States Biochemical) で配列決定して、望ましい変異の存在を確認した。対応dsDNAを用いて、プラスミドpSM671 CBS20

5.94で修飾遺伝子をサブクローニングした。

#### 【0073】実施例4 プラスミドpSM671での変異体のサブクローニング

プラスミドpSM671 (1μg) を20μlの最終容量で制限酵素EcoRIおよびHind IIIで切断した。平行して、複製形の変異体バクテリオファージDNAを20μlの最終容量で制限酵素EcoRIおよびHind IIIで別に切断した。次いで約920bpの断片として得られた修飾遺伝子を、切断混合物の一部 (5μl) を約50ngの切断プラスミドpSM671と結合させることによりサブクローニングした。リガーゼ混合物を用いて、エレクトロコンピテント化されたE.coli 71/18の細胞を形質転換させ、形質転換株をクロラムフェニコール20μg/ml含有のLBのプレートで選択した。陽性クローンから抽出されたプラスミドDNAを配列決定することにより再チェックした。修飾遺伝子を有するプラスミドは表2で示されている。

【0074】

表2

クローン	プラスミド	変異
SMC344	pSM758	Met184Leu
SMC345	pSM759	Thr212Ala
SMC346	pSM760	Thr262Ala
SMC347	pSM761	Met184Leu-Thr212Ala
SMC348	pSM762	Met184Leu-Thr212Ala-Thr262Ala
SMC349	pSM763	Thr212Ala-Thr262Ala-Phe304Ile
SMC350	pSM764	Met184Leu-Thr212Ala-Thr262Ala-Phe304Ile
SMC351	pSM765	Thr262Ala-Phe304Ile
SMC356	pSM770	Met184Leu-Thr262Ala
SMC357	pSM771	Thr212Ala-Thr262Ala

#### 【0075】実施例5 変異体クローンの発現

変異体クローンの単一コロニーを20μg/mlのクロラムフェニコールが加えられたLB培地5mlを各々が含有する50mlフラスコに接種し、攪拌下 (200rpm) 37℃で16時間インキュベートした (DO<sub>600</sub> 約4)。コントロールとして、ヒスチジンテイルに融合された野生型カルバモイラーゼ遺伝子を有するプラスミドpSM716を含むE.coliの株を上記と同様の条件下で培養した。

【0076】次いで培養物を12000rpm (SJ14 (商標名) ローター, Beckman) で1分間遠心した。こうして回収された細胞を300μlの溶解緩衝液20mM NaPO<sub>4</sub>、20%グリセロールに再懸濁し、超音波処理 (Soniprep (商標名) 150、中電圧で1分間のMSEインパルス) により溶解させた。各溶解物の一部 (20μl) を10%SDS-PAGEにより分析した。電気泳動分析では、すべての酵素が互いにおよび野生型酵素と匹敵する発現レベルであることを示した。

#### 【0077】実施例6 修飾酵素の熱安定性試験

変異体の熱安定性は、グリセロールのない溶解緩衝液で得られた可溶性細胞抽出物の様々な分画を異なる温度で加熱し、その後D-フェニルグリシンのカルバモイル (C<sub>D</sub>PG) の残留活性を計算する技術を用いて検討した。

【0078】実際には、細胞抽出物を20mMリン酸緩衝液pH7で適度に希釈し、各々が等しい酵素活性を含んだこれらの一部 (100μl) を50~80℃の温度で30分間インキュベートした。陽性コントロールは氷中で保った。

【0079】次いで0.2Mリン酸緩衝液pH7中D-フェニルグリシンのカルバモイル (C<sub>D</sub>PG) の0.12M溶液500μlを各細胞抽出物および陽性コントロール50μlに加えて、残留酵素活性を決定した。100%とみなされた活性値は、熱処理に付されなかった試料で決定された。

【0080】こうして得られた不活化曲線から、酵素の50%が不活化された温度として規定されるT<sub>50</sub>値を計算した。結果は図1で示され、■野生型株；+変異体

184 ; \*変異体212 ; □変異体262 ; ×変異体184-212 ; ◇変異体184-262 ; △変異体212-262 ; ○変異体184-212-262表3は、各サンプルで行われた様々な実験の平均として計算され

た $T_{50}$ 値と、 $\Delta T_{50}$ 値について示し、各データのばらつきは $\pm 0.1 \sim \pm 0.3^\circ\text{C}$ である。

【0081】

表3

カルバモイラーゼ変異体	$T_{50}^\circ\text{C}$	$\Delta T_{50}^\circ\text{C}$
野生型	61	-
Met184Leu	62.6	1.6
Thr212Ala	65.8	4.8
Thr262Ala	70	9.0
Thr262Ala-Phe304Ile	69	8.0
Met184Leu-Thr212Ala	73.8	12.8
Met184Leu-Thr262Ala	70.2	9.2
Thr212Ala-Thr262Ala	74	13
Met184Leu-Thr212Ala-Thr262Ala	73.8	12.8
Thr212Ala-Thr262Ala-Phe304Ile	72.4	11.4
Met184Leu-Thr212Ala-Thr262Ala-Phe304Ile	73.1	12.1

【0082】これらの結果は、1以上のアミノ酸残基の置換がカルバモイラーゼの熱安定性を増加させることを示している。

【0083】実施例7（比較）

- 1) 5' GTC GGT GAA ATA CCA CCG CGG GAA  
3' は変異His58→Tyrを挿入する。
- 2) 5' CGT CAG ATG ATC ATG CTG GGG AAC  
TTC GGG ATT GTG 3' は変異Pro204→Gluを挿入する。
- 3) 5' CAG CAT GCA TCC CTC CTC CAT GCC  
AGC CTT GCC GCC 3' は変異Val237→Alaを挿入する。

【0084】番号付けはカルバモイラーゼの最初のメチオニン（Met）を考慮している。

【0085】サブクローニングは実施例4で記載されたように操作してプラスミドpSM671で行った。望ましい変異を有するクローンを特定し、より熱安定性であることがわかった本発明の変異体と比較して分析した。

【0086】表4で示された等量の野生型クローンおよび変異体の細胞を20mM NaPO<sub>4</sub> pH7および20%グリセロールを含有した緩衝液500μlに再懸濁し、超音波処理した。得られた可溶性細胞抽出物を活

前記例で記載されたように作られた変異体の一部は、下記オリゴヌクレオチドを用いて特定部位変異誘発により作られた公知技術（EP-610517）の変異体と比較した：

性試験および電気泳動分析により分析した。結果は表4と図2で各々示されている：レーン1および9、標準カルバモイラーゼ；レーン2、w. t. カルバモイラーゼ；レーン3、変異体184-212；レーン4、変異体184-262；レーン5、変異体212-262；レーン6、変異体184-212-262；レーン7、変異体58-237；レーン8、変異体58-204-237。表4は可溶性タンパク質についてU/mlおよびU/mgで表示された活性データを示す。

【0087】

表4

変異体	活 性	
	U/ml	U/mg
野生型	1.25	0.64
Met184Leu-Thr212Ala	1.71	0.83
Met184Leu-Thr262Ala	2.00	1.01
Thr212Ala-Thr262Ala	1.58	0.83
Met184Leu-Thr212Ala-Thr262Ala	1.62	0.89
His58Tyr-Val237Ala	0.63	0.36
His58Tyr-Pro204Glu-Val237Ala	0.82	0.45

【0088】実施例8 単一プロモーターにより調節されたオペロン発現系の構築

より熱安定な変異体の遺伝子を野生型ヒダントイナーゼ遺伝子とタンデムに結合させて、単一プロモーターにより調節されたオペロン発現系を作製した。約1 $\mu$ gのプラスミドpSM761、pSM762、pSM763およびpSM764を制限酵素Hind IIIおよびPst Iで切断し、酢酸Naおよびエタノールで沈降させ、DNAを20 $\mu$ lのTE緩衝液に再懸濁した。

【0089】カルバモイラーゼ-ヒダントイナーゼオペロンを含んだプラスミドpSM700 (6 $\mu$ g) CBS 668.95を制限酵素Hind IIIおよびPst Iで切断し、0.8%低融点アガロースゲルに担持させた。RBS配列より前にあるヒダントイナーゼ遺伝子に相当する約1400bpのバンドを切り出し、DNAを“凍結-圧搾”により抽出した (Anal. Biochem., 132:14, 1983)。

【0090】この方法では、バンドを最初に過剰の緩衝液0.3M酢酸Na、1mM EDTA、pH7.1中で5~10分間平衡化させ、その後取り出して、シリコンガラスウールのフロックを含有したボトム上にうが

たれた (perforated) 0.5ml エッペンドルフ試験管の中に入れる。その後その試験管を1.5ml エッペンドルフ試験管中に挿入する。次いでこれを-80℃で20分間凍結し、直後に室温で15分間マイクロ遠心管で遠心する。溶出されたDNAを1.5ml試験管に回収し、エタノールで沈降させ、0.1%酢酸および10mM MgCl<sub>2</sub>の添加後、最後に20 $\mu$ lのTEに再懸濁する。

【0091】上記のように切断されたプラスミド約30ngを10 $\mu$ lの最終容量で約1400bpの断片5 $\mu$ lと結合させた。リガーゼ混合物を用いてコンピテントE.coli 71/18を形質転換させ、形質転換株をLB-クロラムフェニコールプレートで選択した。陽性クローンから抽出されたプラスミドDNAは変異カルバモイラーゼ遺伝子および野生型ヒダントイナーゼ遺伝子から作製されたオペロンに相当する約2300bpの断片を含んでいた。表5はそのオペロンを含んだクローンおよびプラスミドを示している。

【0092】

表5

変異カルバモイラーゼ

野生型ヒダントイナーゼオペロン

クローン	プラスミド	
SMC352	pSM766	Met184Leu-Thr212Ala-Thr262Ala-Phe304Ile
SMC353	pSM767	Met184Leu-Thr212Ala-Thr262Ala
SMC354	pSM768	Thr212Ala-Thr262Ala-Phe304Ile
SMC355	pSM769	Met184Leu-Thr212Ala

#### 【0093】実施例9 オペロンの発現

クローンSMC352、353、354および355の単一コロニーを20 $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールが加えられたLB培地5mlを各々が含有する50mlフラスコに接種し、攪拌下(200rpm) 37℃で16時間インキュベートした(DO<sub>600</sub>約4)。コントロールとして、ヒダントイナーゼ遺伝子に融合された野生型カルバモイラーゼ遺伝子を有するプラスミドpSM700を含むE.coli SMC327の株を同様の条件下で培養した。

【0094】次いで培養物を12000rpm (SJ14 (商標名) ローター, Beckman) で1分間遠心し、こうして得られた細胞を300 $\mu$ lの溶解緩衝液20mM NaPO<sub>4</sub>、20%グリセロールに再懸濁し、超音波処理 (Soniprep150、中電圧でMSE1分間インパルス) により溶解させた。各溶解物20 $\mu$ lを10%SDS-PAGEにより分析した。電気泳動分析では、すべての酵素が互いに匹敵する量で、しかも野生型オペロンの発現レベルで発現されることを示した。

#### 【0095】B) 酵素活性の決定

クロラムフェニコール (20 $\mu$ g/ml) が加えられたLB培地50mlを含有するフラスコにクローンSMC327およびSMC355のプレ培養物を接種し、約4の光学密度DO<sub>600</sub>まで室温でインキュベートした。その

後、等量の細胞を取り出し、緩衝液0.2M NaPO<sub>4</sub> pH8.5に再懸濁し、超音波処理した。可溶性フラクションを遠心により回収し、生じるカルバモイルおよびアミノ酸の量の合計からなるヒダントイナーゼ活性とカルバモイラーゼ活性の程度測定のために用いた。

【0096】ヒダントイナーゼ活性試験は20mM D, L-p-ヒドロキシフェニルヒダントインを含有した緩衝液0.2M NaPO<sub>4</sub> pH8.0 3.5mlに細胞抽出物100 $\mu$ lを加えることにより40℃で行った。時間の間隔をあけて、反応混合液の一部 (0.6ml) を取り出し、直ちに水中15%トリクロ酢酸0.2mlで処理した。沈降したタンパク質を遠心により除去し、Ehrlich試薬 (濃HCl中10%4-ジメチルアミノベンズアルデヒド) 0.25mlを形成されたカルバモイルについて438nmで比色測定のために上澄0.5mlに加えた。平行して、アミノ酸の含有率はWeatherburn, M.W. (Anal. Chem., vol. 39, 971, 1967) の操作に従い Berthelot試薬を用いて反応混合液の一部 (50 $\mu$ l) について625nmで比色測定した。

【0097】酵素単位とは、上記試験条件下40℃において1分間で1マイクロモルのヒダントインを加水分解する酵素の量をいう。カルバモイラーゼ活性は0.12M D-カルバモイル-p-ヒドロキシフェニルグリシンを含有した緩衝液0.2M NaPO<sub>4</sub> pH7.0

0.5 ml 中40℃で測定した。アミノ酸の含有率は、反応混合液50μlを取り出して上記のように操作することにより、異なる反応時間で測定した。酵素単位とは、上記試験条件下40℃において1分間で1マイクロ

モルのカルバモイルを加水分解する酵素の量をいう。結果は下記表6で示されている。

【0098】

表6

株	タンパク質 (mg/ml)	カルバモイラーゼ (U/mg)	カルバモイラーゼ (U/ml)	ヒダントイナーゼ (U/mg)	ヒダントイナーゼ (U/ml)
SMC327 (pSM700)	28.42	13.18	0.46	1.92	0.07
MC355 (pSM769)	22.63	17.46	0.77	2.25	0.1

【0099】表で示された結果から、カルバモイラーゼ遺伝子に二重変異を有するクローンでは、熱安定性の増加だけではなく、カルバモイラーゼおよびヒダントイナーゼ活性の改善もあることがわかる。

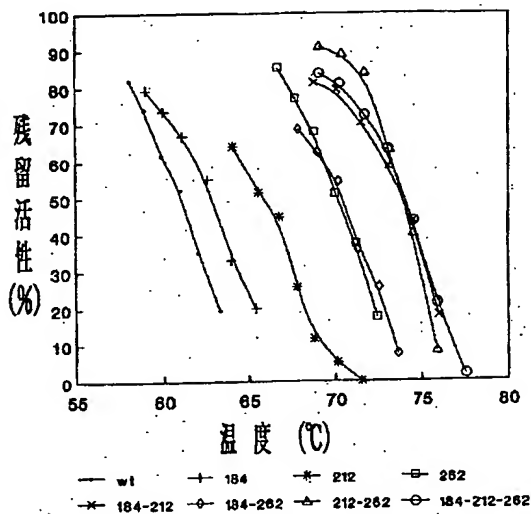
【図面の簡単な説明】

【図1】野生型および変異体の熱安定性をD-フェニルグリシンのカルバモイル(CDPG)の残留活性によって示した図である。■：野生型株；+：変異体184；\*：変異体212；□：変異体262；×：変異体18

4-212；◇：変異体184-262；△：変異体212-262；○：変異体184-212-262。

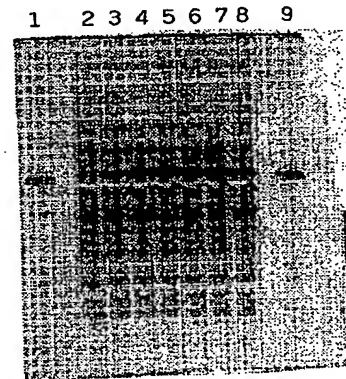
【図2】野生型および変異体の細胞抽出物の電気泳動写真である。レーン1および9：標準カルバモイラーゼ；レーン2：野生型カルバモイラーゼ；レーン3：変異体184-212；レーン4：変異体184-262；レーン5：変異体212-262；レーン6：変異体184-212-262；レーン7：変異体58-237；レーン8：変異体58-204-237。

【図1】



【図2】

図面代用写真



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

(C12N 1/21

C12R 1:125)

(C12N 9/88

C12R 1:91)

識別記号 片内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 ジュリアーノ、ガルリ  
イタリア国サン、ドナート、ミラネーゼ、  
ピア、フェルランディーナ、14/A

(72)発明者 グイド、グランディ  
イタリア国セグラテ、ノナ、ストラー  
ダ、4